



Здружение за заштита на растенијата
на Република Македонија

Society for Plant Protection
of Republic of Macedonia

MAK-ISSN-1409-5084

UDC 632

ЗАШТИТА НА РАСТЕНИЈА



PLANT PROTECTION

ГОДИНА XIX

VOLUME XIX

СКОПЈЕ - SKOPJE
2008



Здружение за заштита на растенијата на Република Македонија
Society for Plant Protection of Republic of Macedonia

Редакциски одбор:

Станислава Лазареvsка
Миле Постоловски
Мирко Михајловски
Ефтим Анчев
Ташко Костов
Петар Јованчев

Издавачки одбор:

Филип Пејчиновски
Ефтим Анчев
Миле Постоловски
Ташко Костов
Мирко Михајловски
Ристо Лозановски
Љупка Хаџи-Ристова
Љубе Василев
Благоја Иванов
Станислава Лазареvsка
Петар Јованчев
Бранко Балтовски

Главен уредник:

Станислава Лазареvsка

Одговорен уредник:

Миле Постоловски

**Јазично уредување
на македонски јазик:**

Лидија Антоновска

**Јазично уредување
на англиски јазик:**

Дејвид Б. Грахам

Техничко уредување:

АЛФА 94

Слика на насловна страна:

автор: Мазен Буфаур

Редакција и администрација:

Бул. Александар Македонски бб
1000 Скопје, Република Македонија
тел: +389 2 3115227
www.zastitanarastenija.makedonico.com

Editorial Staff:

Stanislava Lazarevska
Mile Postolovski
Mirko Mihajlovski
Eftim Ancev
Tasko Kostov
Petar Jovancev

Editorial Board:

Filip Pejcinovski
Eftim Ancev
Mile Postolovski
Tasko Kostov
Mirko Mihajlovski
Risto Lozanovski
Ljupka Hadzi-Ristova
Ljube Vasilev
Blagoja Ivanov
Stanislava Lazarevska
Petar Jovancev
Branko Baltovski

Editor in Chiff:

Stanislava Lazarevska

Responsible Editor:

Mile Postolovski

Language Editor

for Macedonian language:

Lidija Antonovska

Language Editor

for English language:

David B. Graham

Technical Editor:

ALFA 94

Cover page picture:

author: Mazen Bufaur

Address of Editorship:

Bul. Aleksandar Makedonski bb
1000 Skopje, Republic of Macedonia
tel: +389 2 3115227
www.zastitanarastenija.makedonico.com

PSEUDOMONAS AGGLOMERANS И PSEUDOMONAS SP. ПРИЧИНТЕЛИ НА ГНИЕЊЕ НА СТЕБЛОТО КАЈ ДОМАТОТ

PSEUDOMONAS AGGLOMERANS AND PSEUDOMONAS SP. AS CAUSES OF TOMATO PITH NECROSIS

С. Митрев, Билјана Ковачевиќ, Емилија Накова, Д. Спасов
S. Mitrev, Biljana Kovacevic, Emilija Nakova, D. Spasov

Универзитет Гоце Делчев – Штип, Земјоделски факултет, Р. Македонија
University Goce Delcev – Stip, Faculty of Agriculture, R. Macedonia

Извадок

Од заболени растенија домот во околината на Струмица кај кои се појавија симптоми на гниење на стеблото изолирани се два вида колонии означени како IPc и IIPc. Двете групи бактерии се Грам негативни, предизвикуваат хиперсензибилна реакција на листови од тутун но не предизвикуваат гниење на кришки компир и не вршат дехидролиза на аргининот. Колониите коишто припаѓаат на групата IPc имаат изглед на пржено јајце со набрана површина, не се флуоресцентни, не образуваат леван и оксидаза и припаѓаат на видот *Pantoea agglomerans*. Колониите од групата IIPc се кремасто бели, мазни и сјајни, флуоресцентни, создаваат леван, оксидаза и припаѓаат на *Pseudomonas* sp.

Клучни зборови: *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas* sp., гниење на стеблото, домот

Summary

Two colonies were isolated from tomato plants showing symptoms of pith necrosis and labelled as IPc and IIPc groups. The strains from both groups are Gram negative, HR positive on tobacco, do not display pectolytic activity and contain no dehydrolyse arginin. Colonies belonging to IPc group had the appearance of a 'fried egg' with a wrinkled surface. They were found to be fluorescence, oxidase and levan negative and belong to the genus *Pantoea agglomerans*. Colonies from the group IIPc were whitish with a smooth surface and had a high textural shine. They were found to be fluorescence, oxidase and levan positive and, belong to the genus *Pseudomonas* sp.

Key words: *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas* sp., pith necrosis, tomato.

Вовед

Симптоми на гниење на стеблото кај домотот се забележани во повеќе земји во светот: Италија (V. Cattara, 1998), Аргентина (Alippi, 2003), Грција (Alivizatos, 1985), Канада (Dhanvanthari, 1990), Саудиска Арабија (Molan, 2007), Турција (Basim, 2004), Шпанија (F. Siverio) итн. Во поранешна Југославија вакви симптоми за прв пат се забележани 1988 година (Мијатович, 1988) и 1994 год. (Арсенијевич, 1994) на територијата на поранешна Република Србија. Симптоми на гниење на стеблото кај домотот можат да бидат предизвикани од повеќе бактерии: *P. corrugata* (Scarlet et. al., 1978), *P. mediterranea* (V. Cattara, 2002), *P. viridiflava* (Mal. & Goumas, 1987), *E. c. subsp. carotovora* (Speights et.al., 1967), *E. c. subsp. atroseptica* (Mal. & Goumas, 1987),

Pseudomonas sp. (Dhanvanthari, 1990), *P. s. pv. syringae* (Susan J.), *Pantoea agglomerans* (Schaad, 2001), *Pseudomonas fluorescens* (Cantore L. P., Iacobellis N.S., 2002) *P. cihorii* (Alivizatos, 1986) и *P. putida*. *Pantoea agglomerans* освен што е изолирана од растенијата и водата позната е и како патоген на луѓето и животните (Geere, 1977). Многу важна особина на оваа бактерија е создавањето на антибиотици поради што широко се употребува во биолошката контрола на некои фитопатогени бактерии како што се *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* и *Erwinia amylovora*, чиешто уништување е многу тешко поради изразената вирулентност и полифалност. Од друга страна пак *Pseudomonas fluorescens* може да ги инактивира антибиотиките коишто ги произведува *Pantoea agglomerans*.

Материјал и методи

Од преминот на болното кон здравото ткиво земен се исечоци со големина од 1cm, измиени во протечна вода, оставени да одстојат петнаесетина минути и мацерирани со дестилирана вода. Суспензијата е оставена да одстои околу половина час пред да биде засејана на хранлива подлога NA и инкубирана на 27°C. По четири дена беа забележани два вида колонии коишто ги поделивме во две групи: IPc и IIPc. На овие изолати, не постари од 24 часа, направени се ЛЮПАТ тестови (Lelliot et al., 1966; Garrett et al., 1966; Klement, 1963), тестирање по Грам (Lelliot et al., 1987), развој на 4°C, 37°C и 41°C (Dye, 1968), редукција на нитрати (Tominga et al., 1978), разлагање на желатин (Schaad, 1980), активност на катализа (Lelliot et al., 1987; Harrigan et al., 1966). За користење на јаглехидратите (трехалоза, аргинин, целобиоза, сахароза, сорбитол, манитол, ескулин и Твин 80) користена е подлога по Dye (1968). Сите извори на јаглехидрати се додадени по стерилизација на подлогата, изладена на 50 °C и крајна концентрација од 0,5% освен скробот и ескулинон коишто се додадени пред стерилизацијата во концентрации од 0,2% и 0,1% последователно.

Утврдувањето на патогеноста е извршено на два начина. Според првиот начин инокулирани се здрави растенија домот стари околу два месеца со инјектирање на 1ml суспензија од бактерии со

концентрација од 10^7 c.f.u со три убода во стеблото, а местото на убод е изолирано со парафилм. Растенијата беа одгледувани во контролирани услови во стакленик на температура од 22 - 24°C и осветлување од четиринаесет часа. Според вториот начин суспензијата е инјектирана во хипокотилот на листот од растенија домот стари четири недели.

Тестот за хиперсензибилност е направен на растенија тутун со инјектирање на бактериска суспензија (10^7 c.f.u) во листот и резултатите се прочитани по 24 часа.

Направен е PCR тест за *P. corrugata* и *P. mediterranea* според протоколот на V. Cattara. Користени се четири пражмери PC1/1 (5' GGATATGAGCCAGGTCTTCG 3'), PC1/2 (5' CGCTCAAGCGCGCGACTTCAG 3'), PC 5/1 (5' CCACAGGACAACATGTCCAC 3') и PC5/2 (5' CAGGCGCTTCTGGAACATG 3') во концентрација од 10 pmol. Крајниот волумен на миксот е 25µl. Покрај пражмерите во соодветната концентрација миксот содржи уште и 1,5mM MgCl₂, 20mM од секој dNTP и 1,25U Taq polymerase. Програмата се состои од еден циклус од 5 min на 94 °C по што следуваат 30 циклуса од 30s на 94°C, 1 min на 62°C, 1 min и 30s на 72°C и крајна екстензија од 5 min на 72 °C еден циклус. Добиените продукти се раздвоени со електрофореза со брзина од 5,7 Vcm⁻¹ во 1,5% агарозен гел. (Cattara, 2000).

Табела 1. Преглед на изолати

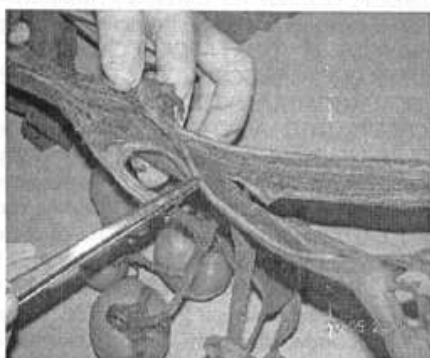
Table 1. Review of isolates

Изолати/Isolates	Вид/Species	Домаќин/Host	Потекло/Origin
IPc-1	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IPc-2	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IPc-3	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IPc-4	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IPc-5	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IPc-6	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IPc-7	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IPc-8	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IPc-9	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IPc-10	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IPc-11	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IPc-12	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IPc-13	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IPc-14	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IPc-15	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>L. esculentum</i>	Просениково
IIPc-1	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>L. esculentum</i>	Моноспитово
IIPc-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>L. esculentum</i>	Моноспитово
IIPc-3	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>L. esculentum</i>	Моноспитово
IIPc-4	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>L. esculentum</i>	Моноспитово
IIPc-5	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>L. esculentum</i>	Моноспитово
IIPc-6	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>L. esculentum</i>	Моноспитово
IIPc-7	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>L. esculentum</i>	Моноспитово
IIPc-8	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>L. esculentum</i>	Моноспитово
IIPc-9	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>L. esculentum</i>	Моноспитово
IIPc-10	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>L. esculentum</i>	Моноспитово
IPVC10.3	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>L. esculentum</i>	Италија
IPVC9.1	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	<i>L. esculentum</i>	Италија
PM	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	<i>L. esculentum</i>	Турција
Ps-225	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>L. esculentum</i>	САД

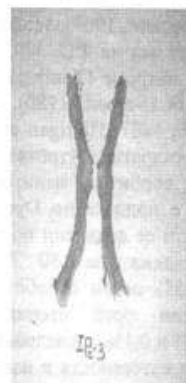
Резултат и дискусија

Од направениот тест за патогеност според првиот начин, првите симптоми беа забележани околу четириесеттиот ден од инокулацијата и тоа во вид на венење на листовите на одделни гранки лоцирани на врвот на растението (симптом којшто е карактеристичен за трахеобактериозите) (Сл. 3 и Сл. 4). При пресекот на стеблото беа забележани истите симптоми на гниење на сржта со темно кафејава боја (Сл. 2). Од реизолацијата на хранлива подлога NA

добиели се колонии со ист изглед и морфологија. Реизолираните колонии од растенијата инокулирани со изолатите од групата IPc по три дена развој на подлога YDC имаат изглед на пржено јајце и големина околу 2,5-3mm, а колонииите од групата IPc имаат кремасто бела боја, мазна и сјајна површина и големина од 3-4mm. Од вториот начин на инокулација резултатите беа забележани по две недели од инокулацијата во вид на силна хлороза и некроза на листовите. Контролните растенија не покажаа симптоми.



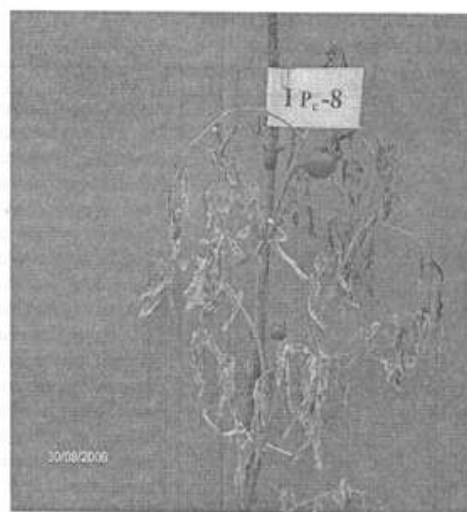
Слика 1. Симптоми на гниење на стеблото
Figure 1. Symptoms of tomato pith necrosis



Слика 2. Карактеристичен симптом кај домотот кај вештачки инокулирано растение
Figure 2. Symptoms of the inoculated plant



Слика 3. Појава на први симптоми по 40 дена од инокулацијата.
Figure 3. First symptoms 40 days after inoculation



Слика 4. Развој на симптомите 40 дена од појавата на првите симптоми.
Figure 4. Symptoms 40 days after the appearance of the first symptoms

Резултатите од тестот за хиперсензибилност беа прочитани наредниот ден по 24 часа и сите изолати покажаа дека предизвикуваат хиперсензибилна реакција на листови од тутун.

Сите изолати се негативни по Грам, немаат пектинолитичка активност односно не

предизвикуваат гниење на компирот, желатинот го разлагаат бавно на 21-от ден, ги редуцираат нитратите во нитрити, образуваат каталаза и се развиваат на 4 и 37°C, но не и на 41 °C. Изолатите од групата IPc не создаваат левац, имаат жолт пигмент, не се флуоресцентни на подлога Кинг Б, не поседуваат

активност на оксидаза, вршат хидролиза на ескулинот, но не го хидролизираат твин 80 и не вршат дехидролиза на аргининот. Од испитуваните јагленихидрати во анаеробни и аеробни услови користат трехалоза, сахароза и манитол, не користат целобиоза а сорбитол користат само во аеробни, но не и во анаеробни услови (Табела 2).

Изолатите од групата IPc образуваат леван, немаат жолт пигмент, флуоресцентни се на подлога

Кинг Б, поседуваат активност на оксидаза, не го хидролизираат ескулинот, не вршат дехидролиза на аргининот, а го хидролизираат твин 80. Од испитуваните јагленихидрати во аеробни и анаеробни услови користат сахароза и манитол, а не користат целобиоза додека пак сорбитол користат само во анаеробни, но не и во аеробни услови (Табела 2).

Табела 2. Биохемиски карактеристики
Table 2. Biochemical characteristics

	IPc	IPc	IPVC10.3	IPVC9.1	PM
Грам	-	-	-	-	-
Леван	-	+	-	-	-
Жолт пигмент	+	-	-	-	-
Флуоресцентност	-	+	-	-	-
Пектолитичка ак.	-	-	-	-	-
Развој на 4 °C	+	+	+	+	+
Развој на 37 °C	+	+	+	+	+
Развој на 41 °C	-	-	+	+	+
Ред. на нитрати	+	+	+	+	+
Оксидаза	-	+	+	+	+
Каталаза	+	+	+	+	+
Желатин	+	+	+	+	+
Аргинин	-	-	+	+	+
Ескулин	+	-			
Твин 80	-	+			
Трехалоза	+	+			
Целобиоза	-/-	-/-			
Сахароза	+/+	+/+			
Сорбитол	-/+	+/+			
Манитол	+/+	+/+			

Заклучок

Забележаните симптоми најпрво не асоцираа на присуството на бактериите *P. corrugata* (Roberts & Scarlet, 1978) и *P. mediteranea* (V.Cattara) коишто предизвикуваат некроза на стеблената срж кај домотот, симптом познат уште како Tomato Pith Necrosis (TPN). Според биохемиските карактеристики изолатите од групата IPc се многу слични со *P. corrugata*, но се разликуваат од неа по тоа што не се оксидазно активни. Изолатите од групата IPc се оксидазно активни, но не образуваат леван за разлика од *P. corrugata* и *P. mediteranea*. Сомнежите дека не станува збор за овие две бактерии коишто широко се распространети во повеќе региони во светот се отфрлени со PCR тестот кој не даде позитивен резултат за нашите изолати. Според M. Fiori (2002) симптомите коишто ги предизвикува *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* кај домотот се многу слични со симптомите коишто ги предизвикува *P. corrugata* поради што лесно можат да бидат помешани. Изолатите од групата IPc по своите морфолошки и биохемиски карактеристики

одговараат на родот *Erwinia* но се разликуваат по една многу важна особина за припадниците на овој род а тоа е што не поседуваат пектинолитички својства. Ова сознание не упати на вистинскиот пат дека изолатите од групата IPc припаѓаат на видот *Pantoea agglomerans* од родот *Pantoea* којшто неодамна е издвоен од родот *Erwinia* поради тоа што поседува жолт пигмент и не поседува пектинолитички својства (Schaad, 2000). Споредувајќи ги биохемиските карактеристики на изолатите од групата IPc со податоците од литературата за фитопатогените бактерии (Schaad, 2000) дојдовме до заклучок дека се многу слични на *Pseudomonas syringae* од која се разликуваат по тоа што се оксидазно позитивни. Исто така, резултатите од направените биохемиски тестирања се многу блиски и до *P. fluorescens*, pv.2 и pv.4 од коишто се разликуваат по тоа што не вршат дехидролиза на аргининот. Од овие причини, засега можеме да заклучиме само дека изолатите од групата IPc припаѓаат на неидентифицираната група од групата на флуоресцентни видови на родот *Pseudomonas*, односно *Pseudomonas* spp. Како краен заклучок од ова истажување можеме да потврдиме дека изолатите од

групата IPc припаѓаат на видот *Pantoea agglomerans* од родот *Pantoea*, фамилија Enterobacteriaceae, ред Enterobacteriales а изолатите од групата IIPc на видот *Pseudomonas* spp., род *Pseudomonas*, фамилија Pseudomonadaceae, ред Pseudomonadales што беше потврдено со PCR и секвенционирање во Универзитетот во Џорџија, Оддел за фитопатологија, САД.

Литература

- Alippi M., Dal Bo E., Ronco L.B., Lopez M. V., Lopez A. C., Aguilar O. M. *Pseudomonas* populations causing pith necrosis of tomato and pepper in Argentina are highly diverse. *Plant Pathology* 52, 287-302.
- Arsenijević M., 1994. Karakteristike bakterije *Pseudomonas* sp., patogena paradajza. *Zaštita bilja*, 45(4), 257-271.
- Anderson Meadow L., Virginia O. Stockwell, Joyce E. Loper. An Extracellular Protease of *Pseudomonas fluorescens* Inactivates Antibiotics of *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology* 94 (11), 1228-1234.
- Andrea Barun-Kiewnick, Barry J. J., David C. S. Biological Control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of basal kernel blight of barley, by antagonistic *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology* 90(4), 368-375.
- Baird R. E., Gitaitis R. D. First report of cotton lint rot by *Pantoea agglomerans* in Georgia. *Plant Disease* 81(5) 551.
- Basim H., Basim E., Yilmaz S., Ilkucan M. First report of pith necrosis of tomato caused by *Pseudomonas mediterranea* in Turkey. *Plant Pathology* 54(2), 240.
- Cantore L.P., Iacobellis N.S. Necrosi corticale e del midollo del pomodoro causata da *Pseudomonas fluorescens* in Puglia. *Informatore Fitopatologico* 4.
- Catara V., Sutra L., morineau A., Achouak W., Christen R., Gardan L. Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. *Int. Jour. of Syst. and Evolutionary Microbiology* 52, 1749-1758.
- Catara V., Arnold D., Cirvilleri G., Vivian A. Specific oligonucleotide primers for the rapid identification and detection of the agent of tomato pith necrosis, *Pseudomonas corrugata*, by PCR amplification: evidence for two distinct genomic groups. *Eur. Jour. of Plant Pathology* 106, 753-762.
- Dhanvantari B.N. Stem necrosis of greenhouse tomato caused by a novel *Pseudomonas* sp.
- Edens D.G., Gitaitis R. D., Sanders F. H., Nitschwitz C. First report of *Pantoea agglomerans* causing a leaf blight and bulb rot of onions in Georgia. *Plant Disease* 90(12), 1551.
- Geere I. W. *Enterobacter agglomerans*: the clinically important plant pathogen. *CMA Journal* 116, 517-519.
- Havesi M., Hudak I., Dorgai L., Szentkiralyi A., Bubán T. *Pantoea agglomerans* HIP32: a new bacterial antagonist to *Erwinia amylovora*. *Phytopathol. Pol.* 39, 79-85.
- Lelliott, R. A., Stead, D. E. (1987). *Methods for Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publication. Oxford London Edinburgh, 1- 329.
- Mirjana Mijatović, Marinković N., Marković Ž., Aleksić Ž. *Pseudomonas* sp., prouzrokovatelj nekroze srži i uvenuća paradajza. *Zaštita bilja* 39 (1), 89-93.
- Schaad N.W., Jones J. B., Chun W. 2000 *Plant Pathogenic Bacteria*. Third edition. APS Press Minnesota, 1-373.